昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, October 2011, 54(10): 1104 – 1110 ISSN 0454-6296

Bcl-2-like 和 Bax-like 蛋白在白蚁生殖蚁和工蚁精子发生过程中的表达比较分析

苏晓红[1,2], 刘 晓[1], 吴 佳[1], 魏艳红[1], 王云霞[1], 邢连喜[1]
(1. 西北大学生命科学学院, 西安 710069; 2. 陕西省动物研究所, 西安 710032)

摘要: 为探讨凋亡调节因子 Bcl-2 和 Bax 蛋白对白蚁生殖蚁和工蚁性腺发育的影响, 揭示白蚁生殖品级与非生殖品级性腺发育的调节机理, 以尖唇散白蚁 *Reticulitermes aculabialis* 为研究对象, 运用免疫细胞化学定位方法对生殖蚁和工蚁精子发生过程中的 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达进行了研究。结果显示: 生殖蚁和工蚁精子发生过程中从精原细胞至精子时期均有 Bcl-2-like 和 Bax-like 的阳性表达。生殖蚁的次级精母细胞、精子细胞和精子中 Bcl-2-like 阳性表达率较高, 而在精原细胞和初级精母细胞中阳性率较低; 工蚁在次级精母细胞中最高, 在精原细胞和初级精母细胞中较低。除初级精母细胞期外, 工蚁生殖细胞其他发育阶段 Bax-like 阳性表达率均显著高于生殖蚁同一阶段生殖细胞。生殖蚁的生殖细胞在精原细胞、初级精母细胞和次级精母细胞时期 Bax-like 阳性表达率较高, 发育至精子时期阳性率最低; 工蚁在次级精母细胞、精子细胞和精子时期 Bax-like 表达率较高, 在初级精母细胞中表达率最低。在精子发生过程中, 生殖蚁生殖细胞 Bax/Bcl 表达量比值逐步下降; 而工蚁生殖细胞发育过程中 Bax/Bcl 表达量比值仅在次级精母细胞期下降, 其他发育时期均升高; 根据 Bax/Bcl 判断, 精原细胞和初级精母细胞是生殖蚁精子发生过程中主要的凋亡点, 而工蚁除了精原细胞和初级精母细胞外, 精子细胞和精子也是主要的凋亡目标。研究结果表明, 白蚁生殖细胞凋亡与其他动物一样受 Bcl-2 家族的调节, 在精子发生过程中 Bcl-2-like 和 Bax-like 表达具有动态变化规律, 正是这种变化调控生殖细胞在不同发育阶段的生或死; Bcl-2-like 和 Bax-like 对生殖细胞凋亡调节不仅在精子发生中有非常重要的作用, 而且可能与工蚁品级的形成有关。

关键词: 尖唇散白蚁; Bcl-2 蛋白家族; Bax 蛋白; 精子发生; 细胞凋亡
中图分类号: Q965 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2011)10-1104-07

A comparative study on expression of Bcl-2 and Bax proteins in germ cells during spermatogenesis in reproductives and workers of termite *Reticulitermes aculabialis* (Isoptera: Rhinotermitidae)

SU Xiao-Hong[1,2], LIU Xiao[1], WU Jia[1], WEI Yan-Hong[1], WANG Yun-Xia[1], XING Lian-Xi[1] (1. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. Shaanxi Institute of Zoology, Xi'an 710032, China)

Abstract: In order to investigate the involvement of Bcl-2 family protein in germ cell apoptosis during spermatogenesis and explore the differences of gonad development between reproductive caste and non-reproductive caste in termites, the expression of Bcl-2 and Bax proteins in germ cells during spermatogenesis of reproductives and workers of termite *Reticulitermes aculabialis* was investigated using immunocytochemical localization method. The results showed that both the immunopositive Bcl-2-like and Bax-like protein existed in germ cells from spermatogonia to sperm stage during spermatogenesis in reproductives and workers. In the reproductives, the expression level of Bcl-2-like was higher in secondary spermatocyte, spermatid and sperm, while lower in spermatogonia and primary spermatocyte. In the workers, a strong expression of Bcl-2-like was shown in secondary spermatocytes, and a lower expression level in spermatogonia and primary spermatocytes. Except for the stage of primary spermatocytes, the expression ratio of Bax-like during spermatogenesis in workers was significantly higher than that in the reproductives. In reproductives, the expression level of Bax-like was higher in spermatogonia, primary spermatocytes and secondary spermatocytes, while the lowest in sperms. Workers had higher expression levels of Bax-like in the secondary spermatocytes, spermatids and sperms, and the lowest expression levels in primary spermaocyte. During spermatogenesis, the expression ratio of Bax/Bcl-2 gradually decreased in

基金项目: 国家自然科学基金项目(31170363); 陕西省自然科学基金项目(2010JM3013); 陕西省教育厅自然科学基金项目(2010JK849)
作者简介: 苏晓红, 女, 1967 年生, 陕西西安人, 副教授, 研究方向为昆虫生理, E-mail: sxhyhy@yahoo.com.cn
收稿日期 Received: 2011-05-30; 接受日期 Accepted: 2011-08-23

germ cells of reproductives. However, in workers the expression ratio only decreased in the secondary spermatocytes and increased in other germ cells. According to the expression ratio of Bax/Bcl-2, spermatogonia and primary spermatocytes were the main targets of apoptosis in reproductives, while in workers the main targets of apoptosis included spermatogonia, primary spermatocytes, spermatids and sperms. The results suggest that in the testis of termite, apoptosis of germ cells is regulated by the pro-and anti-apoptotic members of the Bcl-2 family proteins and the expression of Bcl-2-like and Bax-like show a dynamic change which determines the fate of survival or death of germ cells during spermatogenesis. Bcl-2-like and Bax-like not only play critical roles germ cell apoptosis in the testis, but also can be involved in caste differentiation of termites.

Key words: *Reticulitermes aculabialis*; Bcl-2 family protein; Bax protein; spermatogenesis; apoptosis

在动物的精子发生过程中要求一部分生殖细胞凋亡以保证其他生殖细胞正常发育，因此在正常的精子发生过程中大约有 25% ~75% 的生殖细胞消失掉(Hikim *et al.*, 2003; Heninger *et al.*, 2004)。细胞凋亡是基因调控下的一种程序性细胞死亡，Bcl-2 和 Bax 是主要的凋亡调控蛋白，对生殖细胞凋亡有重要调节作用。Bcl-2 蛋白抑制细胞凋亡，Bax 能对抗 Bcl-2 的生物学活性，起到诱发或促进细胞凋亡的作用。Bcl-2 与 Bax 表达量的相对比值决定细胞的命运，当 Bcl-2 高表达时，可以阻止细胞凋亡；当 Bax 高表达时，诱导凋亡事件的发生(McDonnell *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003; Castanares *et al.*, 2005; 林胜男等, 2008)，但是 Bax 敲除小鼠由于减数分裂前期生殖细胞积聚和缺乏精子而不育(McDonnell *et al.*, 1996; Giampietri *et al.*, 2005)。Bcl-2 和 Bax 对凋亡调控的实现主要是通过调控线粒体中细胞色素 C 的释放来实现的(Cagan, 2003)。细胞凋亡的分子机制在进化中高度保守，与脊椎动物一样，果蝇的精子发生中也存在这种调控途径，果蝇具有的 Bcl-2 蛋白家族与哺乳动物的同源(Igaki and Miura, 2004; Abdelwahid *et al.*, 2007; 刘凯于等, 2008)。凋亡的目的都是为了消除多余的或受损的生殖细胞以维持生殖细胞和支持细胞的适当比例平衡，生殖细胞凋亡对于保证其他生殖细胞的质量有积极作用(Baum *et al.*, 2005)。鳞翅目昆虫滞育的蛹期精子发生过程中生殖细胞的退化是通过凋亡控制的(Polanska *et al.*, 2005; Shimoda *et al.*, 2007)；蜜蜂工蜂性腺的退化就是由生殖细胞凋亡引起(Capella and Hartfelder, 1998; Tanaka and Hartfelder, 2004)。因此，生殖细胞凋亡不仅能使个体在不利环境下保持较高的生殖水平，也是种群在发育过程中适应内外环境的一种主动性的策略。

在所有的社会性昆虫中，白蚁具有最复杂和显著的品级分化(Cornette *et al.*, 2008)，生殖能力的分化是社会性昆虫最主要的特征(Shimada and Maekawa, 2010)。白蚁各品级均有雌性和雄性之分。生殖蚁具有完善的生殖系统而成为繁育的工具;非生殖品级包括工蚁和兵蚁,性腺退化不具有生殖能力。我们在近期的研究中对尖唇散白蚁 *Reticulitermes aculabialis* 的工蚁和生殖蚁的精子发生进行了显微结构比较，研究发现，工蚁虽然有完整的精子发生过程，即有精子的形成，但是其精巢明显小于生殖蚁的精巢；而且工蚁精巢管中有大量生殖细胞呈现凋亡的典型形态学特征，即染色质凝集和边缘化、核固缩、细胞质液泡化(苏晓红等, 2010)。工蚁虽然自身不育，但其性腺发育具有极大的可塑性，它可以根据巢群需要向补充生殖蚁或兵蚁转化，工蚁品级的发育特点与其生殖细胞的发育有密切关系。本研究以尖唇散白蚁为材料，应用免疫细胞化学定位技术检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白在尖唇散白蚁雄性生殖蚁和雄性工蚁精子发生中的分布和水平，研究 Bcl-2 和 Bax 在两个品级精子发生过程中表达的差异,揭示生殖细胞在不同发育时期与凋亡调节有关的动态变化规律,以期为生殖品级和非生殖品级生殖能力差异的调节机制提供组织学依据。

1　材料与方法

1.1　材料与样品制备

尖唇散白蚁 *R. aculabialis* 于 2009 年 5 月份采自西北大学教学楼木质墙裙中，带回实验室放入 75 L 塑料箱中培养，在箱内放入松木并覆盖沙土，定期喷水,室温条件下可长期饲养。在解剖镜下根据腹板特征选取雄性白蚁，包括生殖蚁分飞成虫和工蚁，切取腹部，迅速放入新配置的 Bouin 液固定，4℃过夜。

1.2 免疫细胞化学反应程序

免疫细胞化学反应程序参照武汉博士德生物公司 SABC(Strept Avidin Biotin Complex)试剂盒中提供的方法。取生殖蚁和工蚁实验材料各 20 个，系列酒精脱水，常规石蜡包埋，进行连续切片，切片厚度为 7 μm，贴于涂有多聚赖氨酸的载玻片上。切片经系列酒精脱蜡入水，30% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶；放入枸橼盐酸缓冲液热修复抗原，然后加入 5% BSA(武汉博士德生物公司)封闭液室温放置 20 min。Bcl-2 和 Bax 一抗均为兔抗多克隆抗体(Sigma 公司产品)，37℃孵育 1 h。第二抗体为羊抗兔 IgG(武汉博士德生物公司)，37℃孵育 20 min；滴加 SABC 复合物(武汉博士德生物公司) 37℃孵育 20 min，PBS 洗 5 min ×4 次。DAB 显色 10 min，苏木精轻度复染。阴性对照用 PBS 代替一抗进行孵育，步骤同上。实验结果在 Olympus CX41 显微镜(日本)下观察，用 Motic Image Plus2.0 数码图像采集系统拍照。

1.3 数据统计和处理

每组取 10 个材料的实验切片，在显微镜下对精巢中各时期生殖细胞的总数目和阳性细胞数进行统计，计算阳性率(%)。数据为平均值 ± 标准误，各参数值经 *t* 检验均符合正态，单因子方差分析，数据经 SPSS 16.0 软件处理，制图用 Excel 2003 软件制作。

2 结果与分析

2.1 生殖蚁与工蚁各期生殖细胞 Bcl-2-like 阳性表达率的比较

生殖蚁和工蚁精子发生过程中从精原细胞至精子时期均有 Bcl-2-like 的阳性表达，阳性物质表达在细胞质和细胞核中(图版Ⅰ：A，B)。生殖蚁和工蚁各期生殖细胞 Bcl-2-like 阳性表达率的结果见表 1。生殖蚁的次级精母细胞、精子细胞和精子中 Bcl-2-like 阳性表达率较高，而在精原细胞和初级精母细胞中阳性率较低；工蚁在次级精母细胞中最高，在精原细胞和初级精母细胞中较低。生殖蚁与工蚁生殖细胞在相同发育时期阳性率相比有显著或极显著差异。

2.2 生殖蚁与工蚁各期生殖细胞 Bax-like 阳性表达率的比较

生殖蚁和工蚁精子发生过程中各发育时期生殖细胞中均有 Bax-like 的阳性表达(图版Ⅰ：C，D)，Bax-like 在生殖蚁和工蚁生殖细胞阳性表达率的比较结果见表 2。生殖蚁和工蚁各期生殖细胞 Bax-like 阳性表达率呈显著性差异，除初级精母细胞期外，工蚁生殖细胞其他发育阶段 Bax-like 阳性表达率均显著高于生殖蚁同一阶段生殖细胞。生殖蚁的生殖细胞在精原细胞、初级精母细胞和次级精母细

表 1 尖唇散白蚁生殖蚁与工蚁各期生殖细胞 Bcl-2-like 阳性表达率

Table 1 The expression level of Bcl-2-like in germ cells of reproductives and workers of *Reticulitermes aculabialis* during spermatogenesis

	精原细胞 Spermatogonium	初级精母细胞 Primary spermatocyte	次级精母细胞 Secondary spermatocyte	精子细胞 Spermatid	精子 Sperm
生殖蚁 Reproductive	31.5 ±3.1	44.1 ±3.2	70.8 ±5.1	83.1 ±8.0	73.4 ±6.0
工蚁 Worker	38.3 ±3.2 **	23.1 ±2.8 **	81.9 ±6.2 *	60.9 ±6.2 **	57.3 ±4.9 **

* 工蚁和生殖蚁之间有显著性差异($P<0.05$, *t* 检验) Significant difference between workers and reproductives ($P<0.05$, *t* test); ** 工蚁和生殖蚁之间有极显著性差异($P<0.01$, *t* 检验) Extremely significant difference between workers and reproductives ($P<0.01$, *t* test). 表 2 同 The same for Table 2.

表 2 尖唇散白蚁繁殖蚁与工蚁各期生殖细胞 Bax-like 阳性表达率

Table 2 The expression level of Bax-like in germ cells of reproductives and workers of *Reticulitermes aculabialis* during spermatogenesis

	精原细胞 Spermatogonium	初级精母细胞 Primary spermatocyte	次级精母细胞 Secondary spermatocyte	精子细胞 Spermatid	精子 Sperm
生殖蚁 Reproductive	50.7 ±6.5	53.6 ±6.2	55.1 ±7.8	35.8 ±4.8	11.2 ±1.6
工蚁 Worker	56.6 ±8.4 *	36.9 ±8.7 **	72.9 ±7.8 **	83.4 ±8.5 **	84.4 ±8.4 **

胞时期 Bax-like 阳性表达率较高，发育至精子时期阳性率最低；工蚁在次级精母细胞、精子细胞和精子时期表达率较高，在初级精母细胞中表达率最低。

2.3　Bax-like 与 Bcl-2-like 表达量比值

生殖蚁和工蚁生精细胞在各发育时期 Bax-like 与 Bcl-2-like 表达的比值(Bax /Bcl-2)在表 3 中列出。生殖蚁的生精细胞在精原细胞和初级精母细胞时期 Bax /Bcl-2 相对较高，均大于 1；次级精母细胞、精子细胞和精子的 Bax/Bcl-2 值较低，均小于 1。工蚁的精原细胞、初级精母细胞、精子细胞和精子的 Bax/Bcl-2 值均大于 1，仅次级精母细胞 Bax/Bcl-2 值小于 1。在精子发生过程中，生殖蚁生殖细胞 Bax/Bcl 值逐步下降；而工蚁生殖细胞发育过程中 Bax/Bcl-2 值仅在次级精母细胞期下降，其他发育时期均升高。在精子发生过程中，在精原细胞期生殖蚁的高于工蚁，其他时期均低于工蚁。

表 3　尖唇散白蚁精子发生过程中生殖细胞 Bax-like/Bcl-2-like 表达量比值

Table 3　Expression ratio of Bax-like/Bcl-2-like in germ cells during spermatogenesis in *Reticulitermes aculabialis*

	精原细胞 Spermatogonium	初级精母细胞 Primary spermatocyte	次级精母细胞 Secondary spermatocyte	精子细胞 Spermatid	精子 Sperm
生殖蚁 Reproductive	1.60	1.21	0.77	0.43	0.15
工蚁 Worker	1.48	1.59	0.89	1.36	1.47

3　讨论

3.1　Bcl-2-like 和 Bax-lik 在生殖蚁和工蚁精子发生过程中的表达

白蚁精子发生过程中即从精原细胞发育到精子,生殖细胞发育的各个时期都有 Bcl-2-like 和 Bax-like 的表达，而且在精巢管中定位呈现集中分布的特点。表明这两种蛋白在生殖细胞凋亡中起作用，而且表现为邻近的生殖细胞形成团同步进入凋亡途径。精子发生是一个被精确调控和高度有序的过程，生殖细胞凋亡在精子发生过程中维持生殖细胞动态平衡有重要作用(Baum *et al*., 2005；Shi *et al*., 2010)，在精子发生过程中消除危险、受损或多余的生殖细胞主要是通过细胞凋亡来完成(Heninger *et al*., 2004；Royere *et al*., 2004)。细胞凋亡的分子调节机制在进化过程中是高度保守的，Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白是细胞凋亡路径中关键的调节因子,两者可以形成异源二聚体发挥抑制凋亡调控作用,而 Bax 自身可以形成同源二聚体促进凋亡(Igaki and Miura, 2004)。凋亡是生殖细胞发育所必须的，必须有部分细胞凋亡以保证其他生殖细胞的正常发育，Bax 缺乏的成年雄鼠生殖细胞死亡增加和睾丸明显萎缩，原因是由于生殖细胞发育早期细胞死亡数目减少引起的，Bax 是精原细胞正常发育过程中部分细胞凋亡所必需的(Giampietri *et al*., 2005)。我们的定位研究显示，进入凋亡路径的细胞不是随便地分布于精小管内，而是在精小管内一些邻近的可能凋亡的细胞形成团，这是由于细胞群内细胞之间通过细胞间桥连接造成同步退化(Heninger *et al*., 2004)，同步退化的方式对于凋亡调控更高效，而且可以保证生殖细胞发育的同步性(Kuznetsov *et al*., 2001)。我们在生殖蚁和工蚁精子发生过程中都发现有 Bcl-2-like 和 Bax-like 的表达，显示白蚁生殖细胞凋亡与其他动物一样受 Bcl-2 基因家族的调节。

3.2　Bcl-2-like 和 Bax-lik 在不同发育时期生殖细胞中的表达

本研究结果表明尖唇散白蚁精子发生过程中 Bcl-2-like 和 Bax-like 在不同发育时期的生殖细胞的表达量上存在差异。Castanares 等(2005)用二甲胺四环素诱导大鼠生殖细胞 Bcl-2 水平升高，从而抑制生殖细胞的凋亡。生殖蚁和工蚁精巢中，Bcl-2-like 在次级精母细胞、精子细胞和精子中的表达量相对较高，而在精原细胞和初级精母细胞中表达量较低，说明这些高表达 Bcl-2-like 的次级精母细胞、精子细胞和精子期的生殖细胞凋亡受到抑制的可能性更大，而精原细胞和初级精母细胞出现凋亡的可能性较高。Bax-like 在生殖蚁的精原细胞、初级精母细胞和次级精母细胞中表达量相对较高，在精子中最低；而 Bax-like 在工蚁的次级精母细胞、精子细胞和精子中表达量相对较高，在初级精母细胞中最低，显示了生殖品级和非生殖品级在生殖细胞不同发育阶段凋亡水平上可能具有显著差异。当细胞

进入凋亡途径时，Bcl-2 高表达，可与 Bax 形成异源二聚体 Bcl-2/Bax，阻止 Bax/Bax 形成，进一步阻止细胞色素酶 C 的释放，抑制 caspase 激活，使生精细胞免于凋亡。当 Bax 高表达时，形成 Bax/Bax 同源二聚体，促进细胞色素酶 C 释放，激活 caspase，从而诱导细胞凋亡事件的发生（Yan *et al*., 2000；Baum *et al*., 2005）。Bcl-2 和 Bax 在白蚁生殖品级和非生殖品级生殖细胞不同发育时期的表达水平有显著差异，表明在精子发生过程中生殖细胞凋亡调控具有动态变化规律，正是这种变化调控生殖细胞在不同发育阶段具有不同的凋亡水平。

3.3 生殖蚁和工蚁各期生殖细胞 Bax-lik/Bcl-2-like 表达量比值

Bax-like/Bcl-2-like 表达量比值的结果表明在白蚁的精子发生过程中精原细胞和初级精母细胞是关键的凋亡检测点。细胞对死亡信号的敏感性取决于胞内 Bcl-2/Bax 竞争性的二聚体化过程，它们的比值决定着细胞在凋亡途径中的生存或死亡的命运（McDonnell *et al*., 1996；Castanares *et al*., 2005）。生精细胞的凋亡率与 Bax/ Bcl-2 表达相对值呈线性正相关,凋亡率随着 Bax/Bcl-2 比值的增大而增高（林胜男等, 2008）。我们的研究结果显示在生殖蚁和工蚁精原细胞和初级精母细胞中 Bax-like 和 Bcl-2-like 的比值均大于 1，表明在精子发生中生殖细胞在这两个时期凋亡率较高。在精子发生过程中，精原细胞的有丝分裂期和精母细胞的减数分裂期是关键的 2 个凋亡检测点，在这 2 个时期细胞凋亡的比例最高，大量不能经过检测点的生殖细胞在精原细胞和精母细胞时期就被消除（Baum *et al*., 2005；Shi *et al*., 2010）。根据 Bax/Bcl-2 值推断白蚁的生殖蚁在精子细胞和精子时期细胞凋亡率较低,尤其精子凋亡率最低；工蚁的精子细胞和精子 Bax/Bcl-2 值都大于 1,与精原细胞和初级精母细胞 Bax/Bcl-2 值相近,也具有较高的凋亡率。通常在可生育的动物精子发生过程中，精子细胞和精子的凋亡率是最低的（Baum *et al*., 2005）。工蚁成为没有生殖力的品级与其生殖细胞在各个时期尤其是精子细胞和精子保持高的凋亡率有关。生殖细胞凋亡是动物在发育过程中适应内外环境的一种主动性的策略，生殖蚁和工蚁精巢中生殖细胞 Bax/Bcl-2 比值体现出凋亡程度的差异,揭示了凋亡调节不仅在精子发生中有非常重要的作用，并且可能与工蚁品级的形成有关。

参 考 文 献（References）

Abdelwahid E, Yokokura T, Krieser RJ, Balasundaram S, Fowle WH, White K, 2007. Mitochondrial disruption in *Drosophila* apoptosis. *Developmental Cell*, 12(5): 793 – 806.

Baum JS, George JP, McCall K, 2005. Programmed cell death in the germline. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 16: 245 – 249.

Cagan RL, 2003. Spermatogenesis: borrowing the apoptotic machinery. *Current Biology*, 13: 600 – 602.

Capella ICS, Hartfelder K, 1998. Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *Journal of Insect Physiology*, 44(5 – 6): 385 – 391.

Castanares M, Vera Y, Erkkilä K, Kyttänen S, Lue Y, Dunkel L, Wang C, Swerdloff RS, Hikim AP, 2005. Minocycline up-regulates BCL-2 levels in mitochondria and attenuates male germ cell apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(2): 663 – 669.

Cornette R, Gotoh H, Koshikawa S, Miura T, 2008. Juvenile hormone titers and caste differentiation in the damp-wood termite *Hodotermopsis sjostedti* (Isoptera, Termopsidae). *Journal of Insect Physiology*, 54(6): 922 – 993.

Giampietri C, Petrungaro S, Coluccia P, D'Alessio A, Starace D, Riccioli A, Padula F, Palombi F, Ziparo E, Filippini A, De Cesaris PD, 2005. Germ cell apoptosis control during spermatogenesis. *Contraception*, 72: 298 – 302.

Heninger NL, Staub C, Blanchard TL, Johnson L, Varner DD, Forrest DW, 2004. Germ cell apoptosis in the testes of normal stallions. *Theriogenology*, 62: 283 – 297.

Hikim APS, Lue Y, Diaz-Romero M, Yen PH, Wang C, Swerdloff RS, 2003. Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 85: 175 – 182.

Igaki T, Miura M, 2004. Role of Bcl-2 family members in invertebrates. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1644(2 – 3): 73 – 81.

Kuznetsov S, Lyanguzowa M, Bosch TCG, 2001. Role of epithelial cells and programmed cell death in *Hydra* spermatogenesis. *Zoology*, 104: 25 – 31.

Lin SN, Zhang YH, Li GQ, Wang HY, 2008. Effects of bisphenol A on apoptosis of spermatogenic cells and expression of Bax and Bcl-2 proteins in the Siberian frog *Rana chensinensis*. *Acta Zoologica Sinica*, 54(5): 867 – 876. [林胜男, 张育辉, 李国庆, 王宏元, 2008. 双酚 A 对中国林蛙生精细胞凋亡和 Bax、Bcl-2 表达的影响. 动物学报, 54(5): 867 – 876]

Liu KY, Deng YJ, Zhang XP, Peng JX, Li Y, Hong HZ, 2008. Research progress in programmed cell death in insects. *Acta Entomologica Sinica*, 51(6): 625 – 658. [刘凯于, 邓玉杰, 张许平, 彭建新, 李毅, 洪华珠, 2008. 昆虫细胞程序性死亡的研究进展. 昆虫学报, 51(6): 625 – 658]

McDonnell TJ, Beham A, Sarkiss M, Andersen M, Lo P, 1996. Importance of the Bcl-2 family in cell death regulation. *Experientia*, 52: 1008 – 1017.

Polanska MA, Ciuk MA, Cymborowski B, Bebas P, 2005. Germ cell

death in the testis and its relation to spermatogenesis in the wax moth, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), effects of facultative diapause. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.*, 303 (11): 1013 – 1029.

Royere D, Guerif F, Laurent-Cadoret V, Reviers MTH, 2004. Apoptosis in testicular germ cells. *International Congress Series*, 1266: 170 – 176.

Shi L, Yue W, Zhang C, Ren Y, Zhu X, Wang Q, Shi L, Lei F, 2010. Effects of maternal and dietary selenium (Se-enriched yeast) on oxidative status in testis and apoptosis of germ cells during spermatogenesis of their offspring in goats. *Animal Reproduction Science*, 119: 212 – 218.

Shimada K, Maekawa K, 2010. Changes in endogenous cellulase gene expression levels and reproductive characteristics of primary and secondary reproductives with colony development of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Insect Physiology*, 56(9): 1118 – 1124.

Shimoda M, Kubo-Irie M, Ohta K, Irie M, Mohri H, 2007. Spermatogenesis in the testes of diapause and non-diapause pupae of the sweet potato hornworm, *Agrius convolvuli* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae). *Zool. Sci.*, 24(10): 1036 – 1044.

Su XH, Wang YX, Wei YH, Yin LF, 2010. A comparative study on spermatogenesis in workers, soldiers and reproductives of the termite *Reticulitermes aculabialis*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 47(6): 1104 – 1108. [苏晓红，王云霞，魏艳红，阴灵芳，2010. 尖唇散白蚁工蚁、兵蚁和繁殖蚁精子发生的比较研究. 昆虫知识，2010，47(6)：1104 – 1108]

Tanaka ED, Hartfelder K, 2004. The initial stages of oogenesis and their relation to differential fertility in the honey bee (*Apis mellifera*) castes. *Arthropod Structure and Development*, 33(4): 431 – 442.

Yan W, Suominen J, Samson M, Jégou B, Toppari J, 2000. Involvement of Bcl-2 family proteins in germ cell apoptosis during testicular development in the rat and pro-survival effect of stem cell factor on germ cells *in vitro*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 165(1 – 2): 115 – 129.

Zhang ZH, Jin X, Zhang XS, Hu ZY, Zou RJ, Han CS, Liu YX, 2003. Bcl-2 and Bax are involved in experimental cryptorchidism-induced testicular germ cell apoptosis in rhesus monkey. *Contraception*, 68(4): 297 – 301.

（责任编辑：赵利辉）